

# 植物호르몬에 대한 單클론性 抗體 生産과 利用

黃 台 益\*

## Production of Monoclonal Antibodies to Phytohormones and Its Application

Tay Eak Whang\*

### ABSTRACT

An immunoassay techniques using monoclonal antibodies have been developed of the quantitative analysis of endogenous hormones in plants. In order to be useful for immunoassay, both a high degree of specificity and a high affinity are required. A system is described for production of hybridomas which secrete antibodies aganist the plant hormone. Using the system we were able to produce hybridmas with the desired antibody specificity by cell fusion and culture method.

For a number of obvious reasons, monoclonal antibodies(mAb) were superior to polyclonal antibodies.

Key words : monoclonal antibody, hybridoma, specificity, plant hormone.

### 緒 論

#### 1. 식물 호르몬분석에 면역측정법 도입

생체의 미량물질 검출에 면역측정법의 이용은 1960년 yalow<sup>33)</sup> 등에 의해서 사람 Insulin의 방사면역측정법(RIA, Radioimmunoassay) 개발에 의해서 시작되었다.

식물 호르몬에 대한 면역측정법은 1969년 Fuchs<sup>6,7,8)</sup> 등에 의해서 최초로 시도되어 가능성만을 시사했다. 그로부터 얼마후 Walton<sup>24)</sup>에 의해서 abscisic acid (ABA)에 대한 RIA가 개발 보고 되었으며 Weiler<sup>25,30)</sup>에 의해 ABA에 대한 RIA, 그리고 Indole-acetic acid (IAA)에 대한 RIA와 효소면역 측정법(EIA, enzyme immunoassay)이 개발되었고 계속해서 몇가지 Gibberellin (GA) 등에 대한 보고도 있다. 또한 일본의 yamakuchi<sup>32)</sup>와 Kuroguchi<sup>13)</sup> 등에 의해서 GA에 대한 RIA도 보고 되었다. 그밖에도 면역측정법과 기기분석 즉 GC-MS와 비교 연구안 보고들도 있으며 HPLC-RIA,

즉 HPLC로 분리 정제후 RIA로 검출한 결과도 볼 수 있으며 식물 호르몬 정제를 위한 식물 호르몬체를 이용한 친화성 크로마토그래피를 보고한 경우도 있다.<sup>1, 3, 4, 10, 14, 17, 18, 23)</sup>

최근에는 가토에서 얻은 다세포군 항체(polyclonal antibody, PAb)에서 한 걸음 전진하여 단세포군 항체(=단클론성항체, monoclonal antibody, mAb)를 작성한 보고도 있다. 즉 Weiler 그룹에 의한 ABA<sup>15)</sup>와 IAA<sup>16)</sup>에 대한 mAb생산, 그리고 Beale 과 Knox에 의한 GA에 대한 단클론성 항체 생산과 GA의 항원 epitope에 따른 반응의 차이에 관한 보고들이 돋보이고 있다.<sup>35)</sup>

이처럼 식물 호르몬에 대한 면역측정법은 1985년 Heidelberg에서 열린 제 12차 plant growth substance에 관한 학술회의를 기점으로 하여 80년대 후반에 더욱 활발해지고 있다. 국내에서는 우리 본 연구 그룹에 의해서 80년 초반부터 시작하여 IAA, ABA, GAs, Zeatin에 대한 mAb 생산을 모두 마치고 현재는 면역기간을 단축하여 mAb 생산을 신속히 할 수 있는 연구에 박차를 가하고 있으며, 몇 연

\* 全南大 農大 農學科 Dept. of Agronomy, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea.

구소에서 연구중이거나 보고된 바 있다.

## 2. 단클론성 항체 생산원리

고등동물은 면역체계라는 자기방어능력을 가지고 있다. 즉 외부 異物質(抗原)이 체내에 유입되면 이를 인식하고 특이적으로 결합하여 항원을 무력시키는 물질(면역글로불린 immunoglobulin Ig, 또는 항체)을 분비한다. 일반적으로 항원은 거대분자이며 항체는 항원의 표면 일부를 인식하여 결합한다. 이를 항원 결정기(epitope)라 하고 항원 표면에는 여러가지의 항원 결정기가 존재한다.

동물 체내에는 특이 항원에 결합하는 Ig를 표면에 가진 세포(B-림파구, B-cell)가 존재한다. 이 B-림파구는 각각의 항원 결정기에 상응하는 Ig를 갖게 되고 항원이 계속 유입(booster) 되면 이 림파구는 항원의 자극을 받아 형질세포로 전환되고 수일간 항체를 생산하다가 죽게 되는 면역계의 마지막 단계세포이다. 따라서 항혈청속에는 각종 항원 결정기에 특이적으로 결합하는 항체들이 존재해 있기 마련이다. 그래서 이를 다세포군 항체라 한다.

한편 크론(clone)이란 말은 비성적 유사분열로 증식한 세포군을 일컫는 바 단클론성이란 B-림파구 하나의 세포가 군락을 형성하여 단일 항원 결정기에 대한항체를 분비함을 말한다. 그러나 불행히도 B-림파구는 *in vitro*에서 배양이 되지 않는다. 따라서 세포융합에 의해서 B-림파구에 영원불멸성을 부여해 주는 것이 필요하다. 즉 B-림파구와 불멸성을 가진 골수암세포(myeloma cell)를 융합시켜 림프장종세포(hybridoma)를 만들어 특이 항체를 영원히 생산토록 하는 것이 단클론성 항체생산의 원리인 것이다.<sup>9, 12)</sup>

## 3. 식물 호르몬의 면역측정법

### ○ ELISA .

추적자에 따라서 동위원소를 이용하면 방사면역 측정법이고 효소를 이용하면 효소면역 측정법이라고 한다.

본 ELISA를 위해서는 각 식물호르몬에 대한 항체와 추적자로서 호르몬+효소(주로 alkaline phosphatase (AP)를 이용)의 conjugate가 필수적이며 mAb를 이용할 때는 항체에 대한 항체(anti-mouse IgG antibody), 즉 capture antibody (cAb)가 있어야 된다.

그림 1과 같이 cAb를 polystyrene tube 표면

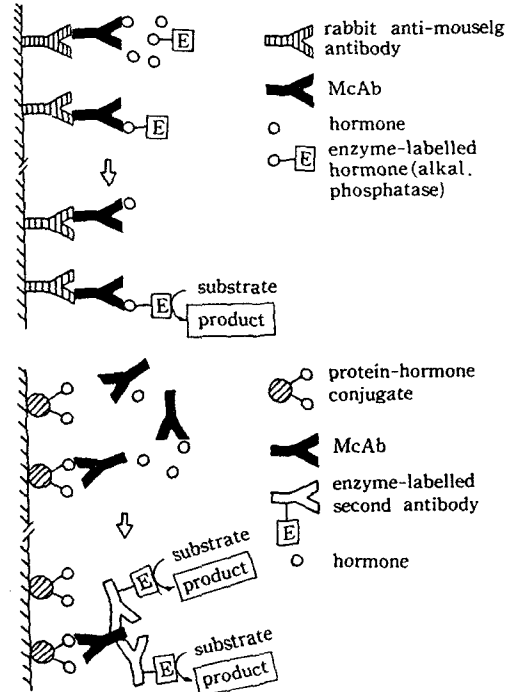


Fig. 1. Principle of ELISA with immobilized antibody(above) of antigen(below)

에 고상화(solid phase, immobilized)한 다음 mAb와 결합시켜서 준비한다. 여기에 시료(알고 있는량 또는 분석코자 하는 시료)와 일정량의 호르몬+AP conjugate를 경쟁적(확률적)으로 결합시킨 후 유리된 시료와 호르몬+AP conjugate를 완전세척 후 효소 기질을 가하여 발색정도의 흡광도를 측정하여 결정한다.<sup>22)</sup>

## 材料 및 方法

실험동물로써 mouse는 Balb/c를 그리고 가토는 califanian 종 등을 사용했다.

세포배양용 배지류는 Gibco 또는 Flow社에서 구입사용하였으며 배양용기 등 plastic 제품들은 NUNC社 또는 Falcon을 사용하였다.

기타시약들은 모두 조직배양용으로 제조된 것들을 사용하였다.

### 1. mAb의 생산

#### 1) 항원준비

식물호르몬들은 그 자체만으로는 항체를 생산하지

못하는 hapten 이기 때문에 거대분자화가 필요하다. 작 홀몬의 COOH기 또는 OH, NH<sub>2</sub> 기 등에 소혈청 albumine 또는 hemocyanin (keyhole limpets) 같은 단백질의 NH<sub>2</sub> 기와 결합체를 이용하여 결합시킨다. 결합후 투석과정을 거쳐서 냉동동결 건조저장하면 변화없이 장기간 사용할 수가 있다.

결합정도를 알아보기 위해서는 결합전에 동위원소 표지 홀몬을 약간 첨가하는 방법과 결합전후 단백질을 황산가수분해에 의한 몇가지 아미노산 흡광도 변화를 추적하여 알 수가 있다.

## 2) 면역

상기 항원을 Balb/c mouse 1 마리당 50~100 $\mu$ g 씩 Freund's complete adjuvant 와 유화하여 (마요네즈와 같이) 근육피하주사 또는 복강에 접종하고 2~3개월까지 3~5 회이상 추가접종(10~30 $\mu$ g) 한다.

## 3) 역가검사

상기 면역된 생쥐의 항원에 대한 반응정도를 알아보기 위해서 꼬리 또는 눈에서 50  $\mu$ l 정도를 capillary 로 채혈, 응고시켜 원심분리(3000 RPM  $\times$  15 min) 하여 항혈청을 얻어 RIA 또는 ELISA 로 역가를 검사한다.

## 4) myeloma cell 준비

골수암세포는 만들기 어렵기 때문에 사용하고 있는 연구소에서 분양받는 것이 좋고 그렇지 않으면 제조회사(ATCC, Flow 사)에서 도입한다. 여러가지의 cell line 이 있는데 자기 특성이 다르기 때문에 잘 고려해야 한다. 본 연구실에서는 P<sub>3</sub> 와 SP<sub>2</sub>/O 계통의 여러가지 cell line 을 보관 이용하고 있다. 일단 cell line 이 도입되면 세포융합 시기와 맞춰 필요량의 cell 을 증식시키고 항상 log-phase 의 중간 정도로 세포의 활력이 높게 유지시켜야 한다.

## 5) 세포융합 및 배양

잘 면역된(역가높은) mouse 의 복부로부터 비장(spleen)을 적출하여 임파세포를 분리하여 계수하고 상기와 같이 준비된 myeloma cell 을 Köhler 와 Milstem<sup>9,12)</sup>의 방법에 따라 polyethylene glycol (PEG)로 융합 시켰다. 융합된 hybridoma는 기본 배지 DMEM 또는 RPMI 1640 에 10~20%의 fetal bovine serum 과 HAT((hypoxanthine, aminopterin, thymidine) 선택배지에서 hybridoma 만 남고 융합되지 않은 세포는 살 수 없음)를 첨가하여 96 well plate 에서 배양하였다. 2주후에 항체

생산여부를 ELISA 로 검색하고 고역가 well 의 세포를 limiting dilution (1 cell/well) 하여 단일세포로부터 세포증식후 다시 역가 검사하여 자기 고역가 세포주를 작성하고 명명을 하였다.

## 6) 항체생산 방법

상기 선발된 세포주를 배양하면, 배지중에 분비된 항체가 함유되어 있다. 그러나 이 배지중에는 5~10 $\mu$ g/ml 정도의 항체만 존재한다. 다량의 항체를 얻기 위해서는 상기 세포주  $1 \times 10^7$ /cell 정도를 1주일전 pristane 0.5ml 가 주사된 mouse 의 복강에 주사하여 복수암을 유발시킨다. 주사후 7~10일 정도가 지나면 복부가 부풀어 오른다. 이때 주사바늘(21G)로 복수를 흘러내려 받는다. 이 복수에는 대개 10~20mg/ml 의 항체를 함유하고 있다. 이러한 배지 또는 복수로부터의 항체는 protein-A sepharose 4B column chromatography<sup>6,11)</sup> 또는 Protein purification system 등을 이용하여 분리 농축시켜 냉동저장 한다.

## 2. ELISA

### 1) CA b

전술한 바와 같이 CA b, 즉 antimouse IgG antibody 는 시판품(sigma 등)을 구입사용할 수 있다. 본 연구실에서는 mouse 혈청 IgG 를 분리하여 가토에 접종하여 mouse IgG 에 대한 항체를 생산하여 사용하고 있다.

### 2) 추적자

ELISA에는 몇가지 종류의 효소(peroxidase urease alkaline phosphatase)가 이용되고 있으나 식물홀몬 분야에는 AP가 주로 이용되고 있다. AP는 식물체에 거의 존재하지 않기 때문에 실제분석에 영향을 주지 않는다. 추적자로 이용하기 위한 효소 단백질에 식물홀몬의 결합은 항원조제의 원리와 기본적으로 동일하다. 다만 효소 또는 홀몬의 양을 비례적으로 줄여서 결합시키면 된다.

홀몬+AP의 conjugate 는 30% glycerol 이 되도록하여 -20 $^{\circ}$ C에 저장해놓고 사용 한다.

### 3) plastic 용기

많은 시료분석을 위해서는 96 well microtiter plate 를 그리고 분석시료가 수가 적을 때는 test tube(9  $\times$  110 mm)를 준비한다(녹십자社, NUNC 등). 이들 제품들은 polystyrene 으로 만들어진 것으로 써 면역 globlin 이 잘 흡착되도록 표면처리 된것을 사용해야 한다.

#### 4) ELISA

상기 준비된 mAb, cAb, hormone + AP plate 를 이용하여 다음 protocol 에 따라서 ELISA 를 수행하였다.

#### I. ELISA Protocol

1. Plate or tube coating : overnight of 4°C 0.2ml cAb(reagent 4).
2. Decant cAb solution, add mAb dilute mAb (reagents) and incubated for overnight at 4°C.
3. Block tube with 200ul of reagent 5.
4. Add to each tube 50ul TBS, 100ul sample or standard and 50ul Ap(reagent 6), mix and incubate tube for/1hr. at room temp. in the dark.
5. Decant and rinse with tube 4~5 times with distilled water.
6. Add 200ul of reagent 7 and incubate for 30 min. at 37°C.
7. Stop enzyme activity with 50ul of 5N KOH.
8. Read absorbance at A 405.

#### II. ELISA reagent.

1. 50mM NaHCO<sub>3</sub> buffer pH9.6
2. TBS(150mM NaCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 50mM Tris pH=7.5).
3. TBS+gelatin(1g gelatin/TBS 1ℓ).
4. Dilute appropriate amount of cAb in reagent 1 (1μg/ml).
5. Dissolve appropriate amount of mAb in reagent 3.(0.1~1μg/ml)
6. Dilute AP-labeled tracer hormone with reagent 3.
7. Fresh prepare substrate, 1mg of p-nitro phenylphosphate (Sigma) per ml of buffer (Sigma direction).
8. Blocking solution 1% bovine serum albumin/ reagent 2).

### 結果 및 考察

#### 1. mAb

##### 1) 항원의 결합율과 면역

항원을 준비하는 과정에서 홀몬과 단백질의 결합율을 높이는 것은 면역측정법 개발의 첩경이다. 따

라서 전술한 바와 같이 동위원소 또는 단백질 가수분해 방법에 의해서 결합율을 확인하는 것이 필요하다.

만일 극히 낮은 결합율을 가진 항원은 아무리 접종을 잘 하여도 목적하는 hapten에 대한 특이항체 생산은 어렵고 필요 없는 거대분자화 시키기 위한 단백질에 대한 항체만 형성하게 될 것이다. 따라서 홀몬과 단백질을 결합시킬 때는 결합시키는 방법에 따라 알맞은 조건의 최적화가 필요하다. 이를 위해서는 우선 홀몬과 단백질의 순도가 중요하고 사용되는 결합제, 특히 용매의 사용에 신중을 기하여 선택해야 된다. 예를 들면 탈수축합 반응에 의해서 결합시킬 때 용매중에 H<sub>2</sub>O가 존재하면 결합반응이 일어나지 않을 때도 있다. 이럴 때는 용매중의 H<sub>2</sub>O를 완전히 제거하거나 처음부터 H<sub>2</sub>O가 없는 용매를 N<sub>2</sub>하에서 조작하는 것이 필요하다.

준비된 항원은 Balb/c mouse(동물은 myeloma cell line 과 syngenic 이어야 함)에 접종할 때 첫 번째는 Freund's complete adjuvant 로, 그리고 추가접종 할 때는 Freund's incomplete adjuvant 와 동량(v/v) 유허하여 접종하는 것이 보통이다. 문제는 얼마만큼의 량을 몇회에 걸쳐서 주사할 것인가에 있다. 흔히 여러차례 접종할수록 높은 역가의 항체를 생산할 수 있을 것으로 생각하고 있으나 빈번한 접종은 오히려 내성이 생겨서 항체생산을 위한 항원에 대한 감각을 저해할 수 있다는 사실도 잘 알려져 있다.<sup>22)</sup> 따라서 본 연구자는 평균 4회최도의 접종에 의해서 역가높은 항체를 생산할 수 있는 임과세포를 얻고 있다.

#### 2) hybridoma 선발

상술한 바와 같이 세포를 융합하고 배양하면 선택배지 이기 때문에 hybridoma 만 살아서 clone 이 형성된다. 이렇게 융합된 hybridoma 는 모두 특이항체를 생산하는 것은 아니다. 특이항체를 생산하는 세포주를 정확하게 잘 선발하는 것은 mAb 생산과정에서 가장 핵심적인 단계이다. Weiler 등은 RIA에 의해서 선발하고 있다. Quarrie<sup>21)</sup> 등에 의한 ABA-mAb hybridoma 선발 방법은 ABA항원을 mitrocellulose sheet 에 고상화시켜 여기에 결합되는 항체를 추적하여 선발할 수 있다고 했으나 본법을 이용하여 선발했던바 항원의 단백질에 결합하는 비특이적 세포주도 선발되는 결과를 가져왔다. 본 연구자 등은 식물 홀몬에 대한 mAb 생산의 경우에 hybridoma 를 선발하면서 cAb를 이용하든가

hapten 을 고상화하여 ELISA 를 하여 선별하는 기술을 개발하여 이용하고 있다.

### 3) mAb의 특성조사

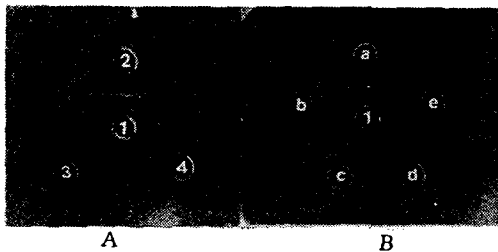
특이 세포주 배양배지 또는 복수종의 항체를 농축 정제한후에 이에 대한 몇가지 특성을 조사해야 한다. 첫째, 역가를 계산해야 한다. 항체를 여러농도로 희석하면서 일정량 동위원소(ex, C<sub>14</sub>-ABA 20,000 cpm)와의 50% 또는 30% 결합 했을 때 희석비율을 결정한다. 실제 실험에서 (RIA)이 농도를 이용한다.

둘째로 생산된 mAb의 isotype 이 어떤 종류인지 확인해야 한다.

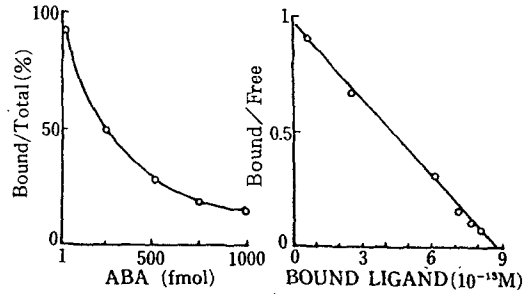
면역 globuline 에는 5 종류의 class 와 이에 따른 subclass 가 있다. 이를 확인하기 위해서는 class 와 subclass 에 대한 항체를 이용하여 ELISA 를 하여 확인 하던지 또는 그림 1 과 같이 Ouchterlony(1958) 의 방법에 따라서 immunodiffusion 하여 확인 할 수 있다. 본 그림에서와 같이 본 연구자들이 작제한 ABA-mAb(WLA-5)의 immunodiffusion 에 의해서 확인한바 IgG<sub>1</sub> type 임을 알 수가 있었다.

셋째로 교차반응에 의한 특이성 검증이다.

생산된 mAb 는 hapten (홀몬)에 대하여 얼마나 특이적으로 반응하느냐 하는 것은 정확한 정량분석을 위해서 대단히 중요하다.<sup>19)</sup> pAb 를 가지고도 충분히 정량분석이 가능한데도 mAb 를 필요로 하는 소이가 바로 이 특이성 때문이다. 여러가지 유사물질



**Fig. 2.** Double immunodiffusion assay of WLA-5<sup>31)</sup> A; class, B; subclass  
 1; ascitic antibody of ABA  
 2; anti mouse IgG(whole serum) antibody  
 3; anti mouse IgA antibody  
 4; anti mouse IgM antibody  
 a; anti mouse IgG<sub>1</sub>  
 b; anti mouse IgG<sub>2</sub>  
 c; anti mouse IgG<sub>2c</sub>  
 d; anti mouse IgG<sub>2b</sub>  
 e; anti mouse IgG<sub>3</sub>



**Fig. 3.** Standard curve for ABA and corresponding Scatchard plot.<sup>31)</sup>

들과 교차반응 결과는 높은 특이성을 입증하고 있으며 mAb 는 pAb 보다 훨씬 특이성이 높음을 알 수 있었다.<sup>31)</sup>

### 4) 정량분석

#### i) hormone 추출과 정제

식물 홀몬의 추출과 정제는 다양하지만 면역측정법의 장점은 복잡한 정제없이 분석할 수 있다는 것이다.

본 연구에서의 식물 홀몬 추출과 정제는 기본적으로 두경우를 택하여 분리하고 있으나 시료에 동위원소 표지 standard 를 가하여 회복과 상실을 조사하여 여러단계를 생략할 수 있고 특히 시료와 용매의 량을 비례적으로 줄여서 speed vac concentrator 를 이용하여 시간을 단축하고 있다.

#### ii) 표준곡선

정량분석을 위해서는 표준곡선이 필요하다. 여러농도의 홀몬존재하에 mAb 를 이용하여 ELISA 를 실시하여 표준곡선을 작성한다. 이 표준곡선을 이용하여 미지의 홀몬을 정량분석 하는데 이용한다.

그림 2 는 ABA-mAb 를 이용한 표준곡선으로서 검출한계는 1 fmol 이고 검출 범위는 1,000 fmol 까지로서 초정밀분석이 가능함을 알 수 있다.

이 표준곡선으로부터 작도한 Scatchard plot 에 의해서 결합상수와 결합용량을 구할 수가 있다.

### 摘 要

식물 홀몬의 면역적 분석은 무엇보다 분석전 복잡한 정제가 필요치 않고 정밀분석을 신속히 할 수 있다는데 그 장점이 있다.

다만 pAb 를 이용하는 경우에 특이성이 다소 문제로 대두되고 있으나 mAb 를 생산 함으로써 크게 개량할 수 있었다. 물론 GA 류에 있어서는 극히 유

사한 구조를 가진 것 끼리의 면역분석은 잘되지 않는 것 처럼 받아들여지고 있으나 이 문제도 epitope를 달리 함으로써 어느 정도 해결 할 수 있으며, 이 경우 HPLC로 정제후 mAb-ELISA를 이용하여 검출하면 훨씬 정확한 분리와 분석이 가능 할 것으로 생각된다.

본 연구자 등은 mAb를 이용한 식물 호르몬 분석에 있어서 시료를 추출, 정제후 실제 ELISA에 의해서 정량분석에 소요되는 시간은 2시간 미만정도 밖에 걸리지 않는다. 또한 검출 한계도 pmol~fmol 정도로 정밀분석이 가능하다. 그리고 소요되는 장비는 간단한 spectrophometer만 가지면 된다.

다만 mAb를 생산하는 과정이 복잡하고 시간이 오래 걸린다. 따라서 필요로 하는 항체를 구입해서 (ABA artiserum sigma) 사용하는 것이 오히려 편리 할 것이다.

본 연구자 등은 mAb를 이용한 식물 호르몬정량분석용 면역키트를 제조하였다.

상기와 같은 여러가지 결과들은 식물 호르몬의 분석에 면역측정법이 편리하게 이용될 수 있음을 시사하고 생각된다.

## 引用 文 獻

- Atzorn, R. and Weiler, E.W. 1983. The immunoassay of gibberellins. *Planta* 159 : 1-6.
- Atzorn, R. and Weiler, E.W. 1983. The role of endogenous gibberellins in the formation of  $\alpha$ -amylase by aleurone layers of germinating barley caryopses. *Planta* 159 : 289-299.
- Badenoch-Jones, J., Letham, D.S., Parker, C.W. and Rolfe, B.G. 1986. Quantitative of cytokinins in biological sample using antibodies against zeatin riboside. *Plant Physiol.* 75 : 1117-1125.
- Daie, J. and Wyse, R.E. 1982. Immunoassay - an alternative for the detection and quantification of small molecules in plants. *Hort. Science* 17(3) : 307-310.
- Ey, P.L., Prowse, S.J. and Jenkin, C.R. 1978. Isolation of pure IgG<sub>1</sub>, IgG2a and IgG2b immunoglobling from mouse serum using protein A-Sepharose. *Immunochem.* 15 : 429-436.
- Fuchs, S. and Fuchs, Y. 1969. Immunological assay for plant hormones using specific antibodies to indol acetic acid and gibberellic acid. *Biochim. Biophys. Acta* 192 : 528-530.
- Fuchs, S., Haimovich, J. and Fuchs, Y. 1971. Immunological studies of plant hormones. Detection and estimation by immunological assay. *Euro. J. Biochem.* 18 : 384-390.
- Fuchs, Y., Mayak, S. and Fuchs, S. 1972. Detection and quantitative determination of abscisic acid by immunological assay. *Planta* 103 : 117-125.
- Galfre, G. and Milstein, C. 1981. Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures. In *Meth. in enzymol.* vol 73, pp 3-46. Academic press, New York.
- Hansen, C.E., Wenzler, H. and Meins, F. Jr. 1984. Concentration gradients of trans-zeatin riboside and trans-zeatin in the maize stem. *Plant Physiol.* 75 : 959-963.
- Kalpaktzogou, P.K., Hong R. and Good, R. A. 1973. The five classes of immunoglobulins in normal C<sub>3</sub>H and BA1B/c mice. *Immunology* 24 : 303-314.
- Kohler, G. and Milstein, C. 1975. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256 : 595-597.
- Kurogochi, S., Yamaguchi, I., Feyerabend, M., Murofushi, N., Takahashi, N., Kuyama S. and Weiler, E.W. 1987. A radioimmunoassay for the dimethyl esters of GA<sub>2</sub>, GA<sub>19</sub>. *Phytochem.* 26 : 2895-2900.
- Madej, A. and Haggblom, P. 1985. Radioimmunoassay for determination of indole-3-acetic acid in fungi and plant. *Physiol. Plant.* 64 : 389-392.
- Mertens, R., Deus-Neumann, B. and Weiler, E.W. 1983. Monoclonal antibodies for the endogenous growth regulator, abscisic acid. *FEBS* 160 : 269-272.
- Mertens, R., Eberle, J., Arnscheidt, A., Ledebur, A. and Weiler, E.W. 1985. Monoclonal antibodies to plant growth regula-

- tors. II. Indole-3-acetic acid. *Planta* 166 : 389-393.
17. Oden, P.C., Weiler, E.W., Schwenen, L. and Graebe, J.E. 1987. comparison of gas chromatography-mass spectrometry, radioimmunoassay and bioassay for the quantification of gibberellin A<sub>3</sub> in Norway spruce (*picea*). *Planta* 171 : 212-219.
  18. Pengelly, W. 1977. A specific radioimmunoassay for nanogram quantities of the auxin, indole-3-acetic acid. *Planta* 136 : 173-180.
  19. Pence, V.C. and Caruso, J.L. 1987. ELISA determination of IAA using antibodies against ring linked IAA. *Phytochem.* 26 : 1251-1255.
  20. Pence, V.C. and Caruso, J.L. 1987. Immunoassay method of plant hormone analysis. In *Plant hormones and their role in plant growth and development* pp 240-256. Martinus Nijhoff Publ.
  21. Quarrie, S.A. and Galfre, G. 1985. Use of different hapten-protein conjugates immobilized on nitrocellulose to screen monoclonal antibodies to abscisic acid. *Anal. Biochem.* 151 : 389-399.
  22. Reading, C.L. 1982. Theory and methods for immunization in culture and monoclonal antibody production. *J. Immun. Meth.* 53 : 262-291.
  23. Sundberg, B., Sandberg, G. and Crozier, A. 1986. Purification of indole-3-acetic acid in plant extracts by immunoaffinity chromatography. *Phytochem.* 25(2) : 295-298.
  24. Walton, D., Dashek, W. and Galson, E. 1979. A radioimmunoassay for abscisic acid. *Planta* 146 : 139-145.
  25. Weiler, E.W. 1981. Radioimmunoassay for pmol-quantities of indole-3-acetic acid for use with highly stable (<sup>125</sup>I)- and (<sup>3</sup>H) IAA derivatives as radiotracers. *Planta* 153 : 319-325.
  26. Weiler, E.W., Jourdan, P.S. and Conrad, W. 1981. Levels of indole-3-acetic acid in intact and decapitated coleoptiles as determined by a specific acid and highly sensitive solid-phase enzyme immunoassay. *Planta* 153 : 561-571.
  27. Weiler, E.W. and Wiczorek, Ute. 1981. Determination of femtomol quantities of gibberellic acid by radioimmunoassay. *Planta* 152 : 159-167.
  28. Weiler, E.W. 1980. Radioimmunoassay for the differential and direct analysis of free and conjugated abscisic acid in plant extracts. *Planta* 148 : 262-272.
  29. Weiler, E.W. 1980. Radioimmunoassay for trans-zeatin and related cytokinins. *Planta* 149 : 155-162.
  30. Weiler, E.W., Eberle, J., Mertens, R., Atzorn, R., Feyerabend, M., Jourdan, P.S., Arnscheidt, A. and Wiczorek, U. 1986. Antisera- and monoclonal antibody-based immunoassay of plant hormones. In *Immunology in plant science. Soci. Experi. Biol. seminar No. 29.* pp27-58. Cambridge Univ. press.
  31. Weiler, E.W. 1986. Plant hormone immunoassay based on monoclonal and polyclonal antibodies. In *Immunology in plant science.* pp.1-17. Springer-Verlag.
  32. Whang, T.E. and Lim, H.O. 1988. Production of monoclonal antibodies against abscisic acid and its application. *Proc. Mol. Biol. & Genet.* 3(2) : 95-100.
  33. Yalow, R.S. and Berson, S.A. 1960. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J. Clin. Invest.* 39 : 1157-1175.
  34. Yamaguchi, I., Nakagawa, R., Kuroguchi, S., Murofushi, N., Takahashi, N. and Weiler, E.W. 1987. Radioimmunoassay of gibberellins A<sub>3</sub> and A<sub>20</sub>. *Plant Cell Physiol.* 28(5) : 815-824.
  35. Also several authors In *Plant growth substances* 1985. pp. 1-44 eds. Bopp, M. Springer-Verlag.